

山 溪,陶美奇,潘永飞,等. 甘蓝 β -淀粉酶基因家族的鉴定及其响应低温胁迫的表达分析[J]. 江苏农业学报,2025,41(2):345-354.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2025.02.015

甘蓝 β -淀粉酶基因家族的鉴定及其响应低温胁迫的表达分析

山 溪, 陶美奇, 潘永飞, 秦文斌, 张振超, 姚悦梅, 戴忠良
(江苏丘陵地区镇江农业科学研究所,江苏 句容 212400)

摘要: β -淀粉酶(*BAM*)是植物水解淀粉的重要酶类,在植物应对非生物胁迫响应中有重要作用。本研究基于甘蓝 *BRAD* 参考基因组的全基因组序列,分离鉴定得到 20 个 *BolBAM* 基因,并对其家族成员进行系统发育分析、蛋白质特征分析、基因结构分析、不同器官/组织中的相对表达量分析、低温(2℃)胁迫下的基因表达模式分析。结果表明,从甘蓝中共鉴定得到 20 个 *BolBAM* 蛋白,*BolBAM* 蛋白的氨基酸序列长度范围是 193 aa(*BolBAM3c*)~678 aa(*BolBAM7*);甘蓝 *BAM* 蛋白家族成员兼有弱酸性、弱碱性蛋白质;除 *BolBAM11*、*BolBAM12*、*BolBAM14* 外,其他 *BolBAM* 蛋白均为亲水性蛋白质。RNA-Seq(转录组)分析结果表明,*BolBAM1b*、*BolBAM5a*、*BolBAM9b* 在 7 个组织/器官中的相对表达量均较高,在花中 *BolBAM1b* 的相对表达量最高,在角果中 *BolBAM5a* 的相对表达量最高,在愈伤组织中 *BolBAM9b* 的相对表达量最高。本研究还发现,在甘蓝耐冷材料 923、冷敏材料 D9 中,14 个 *BolBAM* 基因受到低温诱导表达;冷敏材料 D9 中 *BolBAM3a* 的相对表达量在低温处理 6 h 时高于耐冷材料 923,但在低温处理 24 h 时,其相对表达量显著低于 923;耐冷材料 923 中 *BolBAM3b* 的相对表达量在低温处理 6 h、24 h 时均显著高于冷敏材料 D9。本研究结果为后续开展 *BolBAM3a*、*BolBAM3b* 基因调控甘蓝应对低温胁迫的研究提供了重要参考。

关键词: 甘蓝; *BAM* 基因家族; 低温胁迫; 亚细胞定位

中图分类号: S635.01 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2025)02-0345-10

Identification of β -amylase gene family in cabbage and the expression analysis in response to low temperature stress

SHAN Xi, TAO Meiqi, PAN Yongfei, QIN Wenbin, ZHANG Zhenchao, YAO Yue mei, DAI Zhongliang
(Zhenjiang Institute of Agricultural Sciences of the Ning-Zhen Hilly District, Jurong 212400, China)

Abstract: β -amylase (*BAM*) is an important enzyme in the hydrolysis of plant starch, playing a crucial role in the response of plants to abiotic stress. This study, which was based on the whole genome sequence of the cabbage *BRAD* reference genome, identified 20 *BolBAM* genes. The phylogenetic analysis, protein characteristics, gene structure, and expression levels in different organs or tissues of its family members were analyzed. Additionally, the gene expression patterns under 2℃ low temperature stress were also examined. The results showed that a total of 20 *BolBAM* proteins were identified in cabbage. The amino acid sequence length of *BolBAM* proteins ranged from 193 aa (*BolBAM3c*) to 678 aa (*BolBAM7*).

Members of the cabbage *BAM* protein family included both weakly acidic and weakly alkaline proteins. Except for *BolBAM11*, *BolBAM12*, and *BolBAM14*, all other *BolBAM* proteins were hydrophilic. The RNA-Seq results showed that *BolBAM1b*, *BolBAM5a*, and *BolBAM9b* had relatively high expression levels in seven tissues or organs, with *BolBAM1b* showing the highest expression in flowers, *BolBAM5a* in pods, and *BolBAM9b* in callus tissue. This

收稿日期:2024-03-25

基金项目:2024 年度江苏省青年科技人才托举工程项目(JSTJ-2024-610);江苏省重点研发计划项目(BE2021399)

作者简介:山 溪(1990-),女,河南洛阳人,硕士,助理研究员,主要从事甘蓝类蔬菜遗传育种研究。(E-mail)saiwaicanxue1990@163.com

通讯作者:戴忠良,(E-mail)daizhongliang2008@126.com

study found that the expression of 14 *BolBAM* genes in the cold-resistant material 923 and cold-sensitive material D9 of cabbage was induced by low temperature. The relative expression of *BolBAM3a* in cold-sensitive material D9 was higher than that in cold-resistant material 923 at 6 h of low temperature treatment, but it was significantly lower than that in cold-resistant material 923 at 24 h of low temperature treatment. The relative expression of *BolBAM3b* in cold-resistant material 923 was significantly higher than that in cold-sensitive material D9 at 6 h and 24 h of low temperature treatment. This study provides important insights for further research on the regulation of low temperature response in cabbage by the *BolBAM3a* and *BolBAM3b* genes.

Key words: cabbage; *BAM* gene family; low temperature stress; subcellular localization

甘蓝 (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) 为十字花科芸薹属二年生蔬菜作物。甘蓝叶片从里面充实形成叶球,食用部分不接触农药,因而具备阻隔外界污染的生长特性。此外,甘蓝富含萝卜硫素、维生素,因而成为深受人们喜爱的安全保健型蔬菜。甘蓝适应性、抗逆性强,易贮藏,耐运输,产量高,在中国广泛种植^[1]。

低温是制约植物地理分布、生产和产量的主要非生物胁迫之一^[2],在低温胁迫下,植物中各种酶活性减弱,从而造成光合作用、呼吸作用减弱,进而引起代谢失调。甘蓝适宜的生长温度是15~20℃,近年来,在极端低温和“倒春寒”的影响下,甘蓝受到低温冷害的现象逐年增加,造成甘蓝抽薹^[3],当温度低于甘蓝的耐受程度时,会直接造成幼苗直接冻死或冻伤叶球等后果,严重时还会影响甘蓝的产量^[4-5]。

植物代谢产物与植物对胁迫的响应有很大关系,特别是可溶性糖类、氨基酸、有机酸、多胺类和脂质类物质。当植物受到冷胁迫时,受到显著影响的是碳水化合物代谢,特别是糖代谢^[6-10]。淀粉是植物中分布最广泛的非结构型碳水化合物, α -淀粉酶(*AMY*)、 β -淀粉酶(*BAM*)介导的淀粉降解在碳水化合物代谢中起到重要作用,与植物的胁迫响应有密切关系^[7,11-12]。目前,拟南芥中已知的 *BAM* 基因有 9 个,其中 5 个 *BAM* (*BAM1*、*BAM2*、*BAM3*、*BAM5*、*BAM6*) 具有酶催化活性^[13]。已有研究发现,低温能够诱导植株产生 β -淀粉酶^[14-15]。此外,Seki 等^[16]筛选到低温诱导的 *AtBAM3*;Kaplan 等^[17]已证实,在 5℃ 处理 6 h 后,拟南芥中 *AtBAM3* 的表达量达到峰值。有研究发现,*BAM* 在低温转录诱导下可能加速淀粉降解^[18]。此外,*AtBAM3* 及其同源基因在增强低温耐性方面也表现出相同功能。另外,研究者也发现油菜、马铃薯、茶树、猕猴桃、梨等植物中的 *BAM* 基因具有冷诱导的表达特征^[13,19-24]。双子叶植物、单子叶植物中的 *BAM* 基因均与低温胁迫相关,植物中的 *BAM* 基因在响应低温胁迫过程中发挥的

作用相对保守。

本研究通过对 *BolBAM* 基因家族成员的系统发育、编码蛋白质特征、基因结构、不同器官/组织中的表达量、低温(2℃)胁迫下的基因表达模式分析,筛选出候选的低温诱导基因,分析其在甘蓝中是否具有冷诱导特性,以期为进一步开展 *BolBAM* 基因对低温响应的研究提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 甘蓝 *BAM* 家族成员的鉴定

拟南芥的 *AtBAM1*~*AtBAM9* 蛋白序列是从 TAIR 数据库 (<https://www.arabidopsis.org/>) 中得到的。甘蓝、白菜的全基因组序列分别参考 BRAD (<http://brassicadb.cn/#/>)、Chiifu-401-42 V3.0^[25]。使用隐马尔科夫模型(HMM)在甘蓝、白菜的全基因组数据库中搜索在 N 端有糖结合域 14(PF01373)的序列,从而获得候选甘蓝 *BolBAM*、白菜 *BraBAM* 蛋白序列。用 Pfam (<http://pfam.xfam.org/>)、SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>)、美国国家生物技术信息中心(NCBI) batch CD-search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) 检测 *BolBAM*、*BraBAM* 蛋白的保守结构域,确定甘蓝 *BolBAM*、白菜 *BraBAM* 家族成员。甘蓝 *BolBAM* 基因、白菜 *BraBAM* 基因则根据其其与 *AtBAM* 基因的同源性及其共线性关系,通过添加后缀(a、b……等)进行命名。

1.2 甘蓝 *BolBAM* 系统发育分析和基因结构分析

用 MEGA 7.0 对拟南芥、甘蓝、白菜的 *BAM* 蛋白序列进行聚类分析,采用邻接法(设置 Bootstrap 值为1 000),绘制系统发育树。分别从甘蓝 923 基因组中搜寻获得 *BolBAM* 的 DNA 编码序列(CDS),用 GSDS 2.0 (<http://gsds.gao-lab.org/>) 工具绘制 *BolBAM* 基因结构图。

1.3 BolBAM 蛋白理化性质和保守基序分析

用 ExPaSy (<https://web.expasy.org/protparam/>) 工具分析 BolBAM 蛋白的特性,如相对分子量、脂肪族氨基酸数量、理论等电点、蛋白质疏水性等。用 MEME (<http://meme-suite.org/>) 模体分析工具对 BolBAM 蛋白进行保守基序分析(最大基序设置为 10)。

1.4 BolBAM 基因的物理位置和共线性分析

用 MapChart 软件^[26] 根据 *BolBAM* 的物理位置信息绘制 *BolBAM* 的染色体位置图谱。根据 TAIR (拟南芥基因组数据库)、甘蓝 *BRAD* 基因组和白菜 *Chiifu-401-42 V3.0* 基因组中拟南芥、甘蓝、白菜的 *BAM* 信息,用 TBtools^[27] 对它们之间的直系、旁系同源基因关系进行分析,并绘制共线性图。

1.5 BolBAM 在不同器官/组织及低温胁迫下的表达分析

从 NCBI 的 GEO 数据库中下载甘蓝 02-12 在愈伤组织、根、茎、叶、芽、花和角果中的 RNA-Seq (转录组) 数据(SRA accession 数据集: GSE42891)^[28], 分析 *BolBAM* 在不同器官/组织中的转录水平,用每千碱基转录本每百万映射读长 (Reads) 的片段数

(*FPKM*) 表示 *BolBAM* 的表达丰度,分析 *BolBAM* 在 7 个器官/组织中的相对表达量。

以冷敏甘蓝 D9 (CS-D9)、耐冷甘蓝 923 (CT-923) 为试验材料,将五叶一心期的幼苗转入春化室,进行 2 °C 低温处理,对照幼苗仍处于正常生长状态。分别取处理 6 h、24 h 的叶片,用锡箔纸包裹后立即冷冻于液氮中,保存于 -80 °C 冰箱,用于 RNA-Seq 分析。用 *FPKM* 值绘制 *BolBAM* 的低温表达图。

1.6 BoBAM3a、BoBAM3b 的亚细胞定位

分别在本氏烟草叶片表皮细胞中瞬时表达 BoBAM3a-GFP (绿色荧光蛋白)、BoBAM3b-GFP 融合表达蛋白质,研究 *BoBAM3a*、*BoBAM3b* 基因的亚细胞定位特性。分别用带有 *Sac* I 限制性酶切位点的正向引物、*Xba* I 限制性酶切位点的反向引物进行扩增(引物序列见表 1),再用 *Sac* I、*Xba* I 对 PCR 产物进行酶切,随后将酶切产物连接到 pCambia2300-GFP 载体中,分别将成功构建的载体、空载体转化到农杆菌中,用农杆菌侵染烟草倒三叶、倒四叶,侵染 3 d 后,用 FV10-ASW 激光共聚焦显微镜观察。

表 1 本研究所用引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

基因名称	引物序列(5'→3')
<i>BolBAM3a</i>	AGAACACGGGGACGAGCTCATGGAGTTAACATTAAATTCCTCAAGTTCTC ACCATGCTGTCGACTCTAGACACTAGAGAAGCTTCCTCAACCTT
<i>BolBAM3b</i>	AGAACACGGGGACGAGCTCATGGAATTAACACTGAATTCCTCGAGTTC ACCATGCTGTCGACTCTAGACACTAGAGCGGACTTCCTCAACC

2 结果与分析

2.1 甘蓝 BolBAM 家族成员的鉴定及系统发育分析

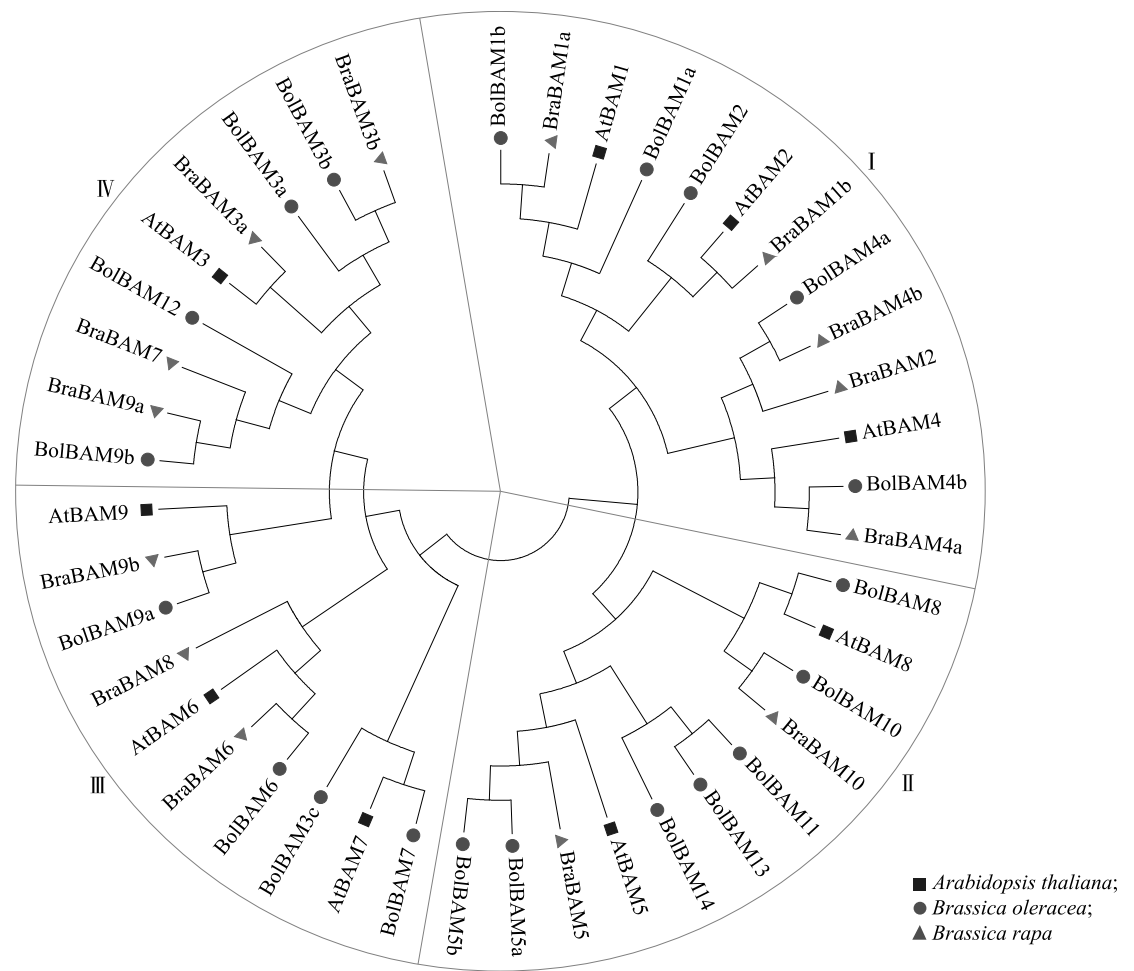
通过对甘蓝、白菜全基因组数据库的 BLASTP 搜索和 N 端糖结合域 14 的验证,共筛选得到 20 个 BolBAM 蛋白和 14 个 BraBAM 蛋白。使用 Pfam (<http://pfam.xfam.org/>)、SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) 和 NCBI batch CD-search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) 进行检测发现,这 20 个 BolBAM 蛋白和 14 个 BraBAM 蛋白均含有 Glyco_hydro_14 保守结构域,根据其 *AtBAM* 基因的同源性来添加后缀(a、b……)进行命名,并构建系统发育树。图 1 显示,这些 BAM 蛋白被分为 4 个不同的亚组,亚组 II 中含有

最多的 BolBAM 蛋白(7 个),亚组 I 含有最多的 BraBAM 蛋白(5 个)。

2.2 甘蓝 BolBAM 家族成员蛋白质理化性质和蛋白质特征分析

由表 2 可以看出,BolBAM 蛋白的氨基酸序列长度范围是 193 aa (BolBAM3c) ~ 678 aa (BolBAM7),对应的开放阅读框 (ORF) 长度范围是 582 bp (BolBAM3c) ~ 2 037 bp (BolBAM7),相对分子量范围是 21 590 (BolBAM3c) ~ 76 340 (BolBAM4a),BolBAM 蛋白的理论等电点范围是 4.90 (BolBAM5b) ~ 9.58 (BolBAM13),BolBAM 蛋白的不稳定指数范围是 25.85 (BolBAM5a) ~ 58.07 (BolBAM13),有 10 个 BolBAM 蛋白不稳定指数超过临界值 40.00。此外,甘蓝 BolBAM 家族成员脂肪族氨基酸指数范围是

62.06(BolBAM3a) ~107.02(BolBAM14), 亲水性平均系数范围是-0.649(BolBAM3c) ~0.554(BolBAM14), 除了 BolBAM11、BolBAM12 和 BolBAM14 外, 其他 BolBAM 蛋白均为亲水性蛋白质。



bootstrap 值设置为 1 000; *Arabidopsis thaliana*: 拟南芥; *Brassica oleracea*: 甘蓝; *Brassica rapa*: 白菜; I ~ IV 表示 BAM 蛋白的 4 个亚组。
图 1 甘蓝、拟南芥和白菜 BAM 蛋白的系统发育树

Fig.1 Phylogenetic analysis of BAM proteins in cabbage, *Arabidopsis thaliana* and Chinese cabbage

表 2 甘蓝 BolBAM 蛋白家族成员的理化特征

Table 2 Physical and chemical characteristics of BolBAM family members in cabbage

编码基因名称	基因编号	染色体编号	开放阅读框长度 (bp)	蛋白质氨基酸序列长度 (aa)	相对分子量	理论等电点	不稳定指数	脂肪族氨基酸指数	亲水性平均系数
BolBAM1a	BolC03g049010.2J	03	1 626	541	60 690	5.94	38.94	71.07	-0.433
BolBAM1b	BolC07g012390.2J	07	1 713	570	63 410	5.48	32.22	70.02	-0.396
BolBAM2	BolC09g000400.2J	09	1 905	634	71 840	5.99	36.89	78.74	-0.410
BolBAM3a	BolC01g024000.2J	01	1 647	548	61 830	8.01	43.15	62.06	-0.616
BolBAM3b	BolC07g046760.2J	07	1 647	548	61 400	6.59	37.80	63.14	-0.581
BolBAM3c	BolC08g016120.2J	08	582	193	21 590	8.70	39.01	62.69	-0.649
BolBAM4a	BolC02g016810.2J	02	2 031	676	76 340	6.13	45.07	76.41	-0.469
BolBAM4b	BolC03g014970.2J	03	1 599	532	60 390	8.71	44.42	76.77	-0.248

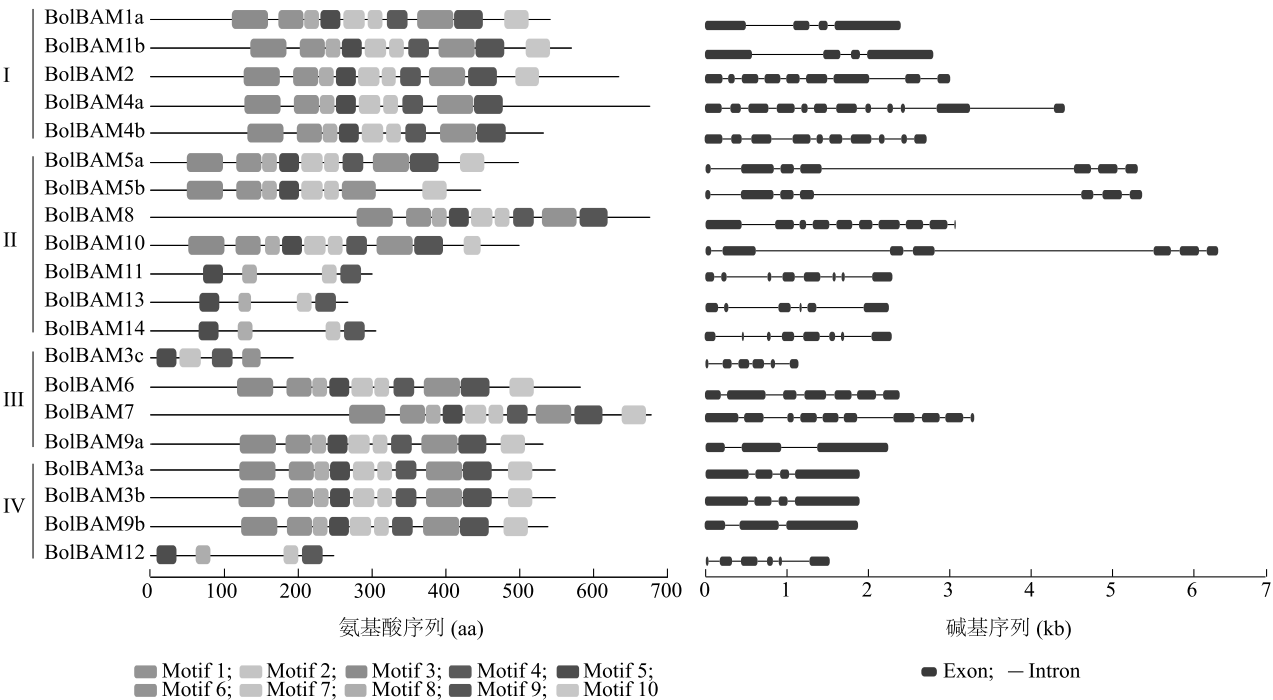
续表2 Continued2

编码基因名称	基因编号	染色体编号	开放阅读框长度 (bp)	蛋白质氨基酸序列长度 (aa)	相对分子量	理论等电点	不稳定指数	脂肪族氨基酸指数	亲水性平均系数
<i>BolBAM5a</i>	BolC08g014500.2J	08	1 497	498	56 210	5.21	25.85	79.72	-0.375
<i>BolBAM5b</i>	BolC08g014480.2J	08	1 344	447	50 460	4.90	29.44	75.93	-0.425
<i>BolBAM6</i>	BolC04g016750.2J	04	1 749	582	66 780	5.77	47.58	76.20	-0.518
<i>BolBAM7</i>	BolC04g007240.2J	04	2 037	678	75 880	5.88	45.56	74.34	-0.484
<i>BolBAM8</i>	BolC02g045740.2J	02	2 031	676	76 240	5.82	41.13	67.68	-0.529
<i>BolBAM9a</i>	BolC03g009670.2J	03	1 596	531	57 950	5.76	32.16	73.24	-0.287
<i>BolBAM9b</i>	BolC09g053850.2J	09	1 617	538	58 920	6.42	34.37	75.95	-0.288
<i>BolBAM10</i>	BolC03g086140.2J	03	1 500	499	57 080	6.08	32.00	74.45	-0.570
<i>BolBAM11</i>	BolC04g055240.2J	04	903	300	33 320	9.00	45.92	103.97	0.492
<i>BolBAM12</i>	BolC04g009440.2J	04	747	248	27 720	9.20	43.65	103.35	0.474
<i>BolBAM13</i>	BolC05g041140.2J	05	804	267	29 640	9.58	58.07	80.37	-0.019
<i>BolBAM14</i>	BolC08g060710.2J	08	918	305	34 130	9.42	45.65	107.02	0.554

用 MEME 在线分析工具分析 BolBAM 蛋白的结构多样性。由图 2 可以看出,亚组 I 中的 BolBAM 蛋白基序相似,同一亚组中大多数 BolBAM 蛋白基序具有保守基序区域。

用 GSDS 绘制 BolBAM 基因的外显子/内含子结

构图,来分析 BolBAM 基因的结构多样性。BolBAM 基因含有 3 个 (*BolBAM9a*、*BolBAM9b*) ~ 12 个 (*BolBAM4a*) 个外显子(图 2)。BolBAM 基因在外显子/内含子结构上存在差异,这可能是其具有功能多样性的原因之一。



I ~ IV :BAM 的 4 个亚组; Motif1 ~ Motif10: BAM 蛋白基序; Exon: 外显子; Intron: 内含子。

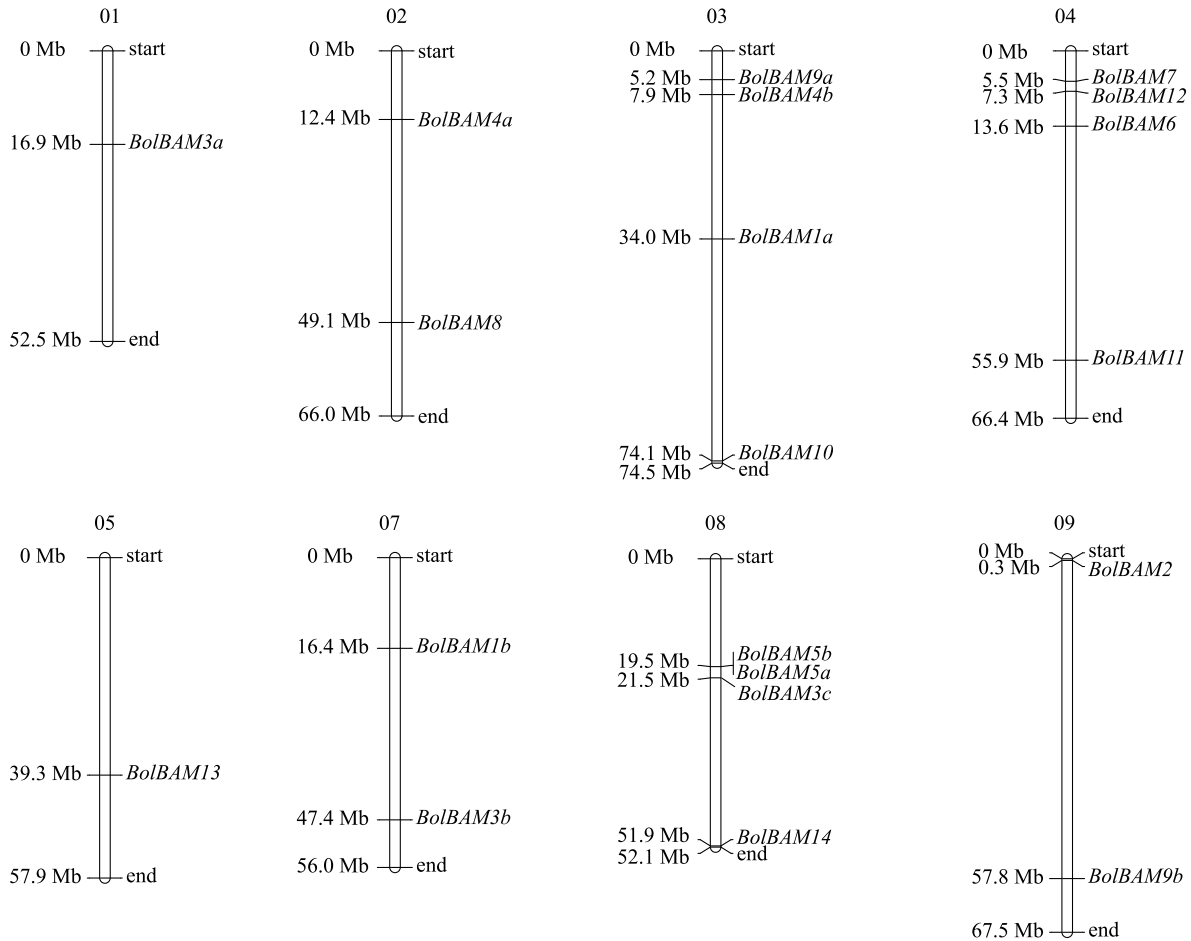
图 2 甘蓝 BolBAM 家族成员 Motif 特征分析结果 (左) 和基因结构分析结果 (右)

Fig.2 The analysis of motif features (left) and exon-intron structure (right) of BolBAM family members in cabbage

2.3 甘蓝 *BolBAM* 家族成员的物理位置和共线性分析

如图 3 所示,20 个 *BolBAM* 家族成员基因被定位在 8 条染色体上,其中 *BolBAM5a*、*BolBAM5b* 串联

分布在 8 号染色体上,1 号染色体、5 号染色体上各只有 1 个 *BolBAM* 基因,2 号、7 号、9 号染色体上各有 2 个 *BolBAM* 基因,其他染色体上均有 *BolBAM* 基因。



01~05,07~09:甘蓝中的 8 条染色体编号。

图 3 *BolBAM* 基因在染色体上的物理位置

Fig.3 Physical distribution of *BolBAM* genes on the chromosomes

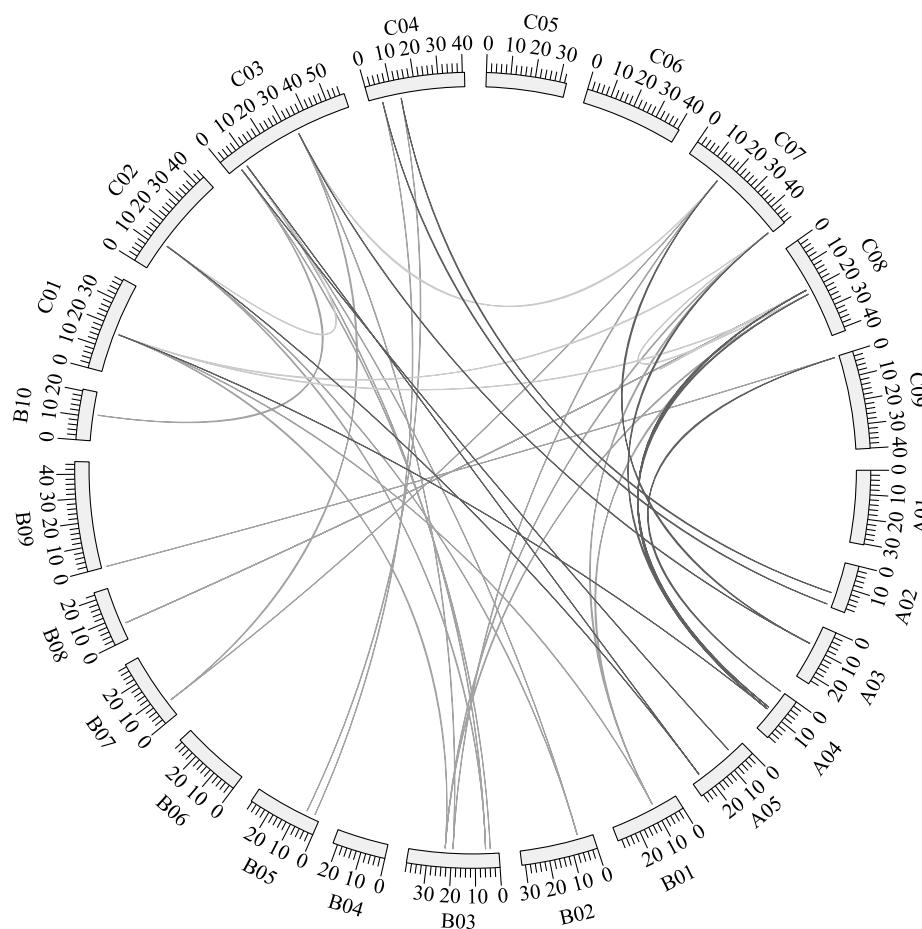
用 BRAD 数据库分别分析甘蓝、拟南芥和白菜之间 *BAM* 基因的直系、旁系同源关系,绘制 *BolBAM*、*BraBAM*、*AtBAM* 基因之间的共线性关系图。如图 4 所示,甘蓝、白菜的 *BAM* 基因在芸薹属特有的全基因组三倍化事件中均被保存下来,且 4 个 *BolBAM* (*BolBAM1*、*BolBAM4*、*BolBAM5* 和 *BolBAM9*) 保留了双拷贝,*BolBAM3* 保留了 3 个拷贝,白菜中 4 个 *BraBAM* (*BraBAM1*、*BraBAM3*、*BraBAM4* 和 *BraBAM9*) 保留了双拷贝。与拟南芥相比,甘蓝 *BAM* 基因家族扩展了 5 个 *BolBAM*,白菜 *BAM* 基因家族扩展了 1 个 *BraBAM*。

2.4 甘蓝 *BolBAM* 基因的转录组表达特性分析

本研究从甘蓝愈伤组织、根、茎、叶、芽、花和角

果中 *BolBAM* 基因的转录表达水平分析了 *BolBAM* 基因。图 5 显示,*BolBAM11*~*BolBAM14* 在各个组织/器官中均没有表达(图 5A 中未展示);*BolBAM10* 仅在芽中表达,且相对表达量较低;*BolBAM1b*、*BolBAM5a*、*BolBAM9b* 在 7 个组织/器官中的相对表达量均较高;*BolBAM1b* 在花中的相对表达量最高;*BolBAM5a* 在角果中的相对表达量最高;*BolBAM9b* 在愈伤组织中的相对表达量最高。

本研究还分析了不同耐寒性甘蓝材料中 *BolBAM* 基因在 2℃ 低温胁迫下的表达模式。图 5 显示,*BolBAM3c*、*BolBAM10*~*BolBAM14* 的相对表达量均为 0,2 个甘蓝材料中 *BolBAM1b* 的相对表达量



A01~A05:拟南芥 1~5 号染色体;B01~B10:白菜 1~10 号染色体;C01~C09:甘蓝 1~9 号染色体。

图 4 甘蓝、拟南芥和白菜的共线性关系

Fig.4 The collinear relationship among cabbage, *Arabidopsis thaliana* and Chinese cabbage

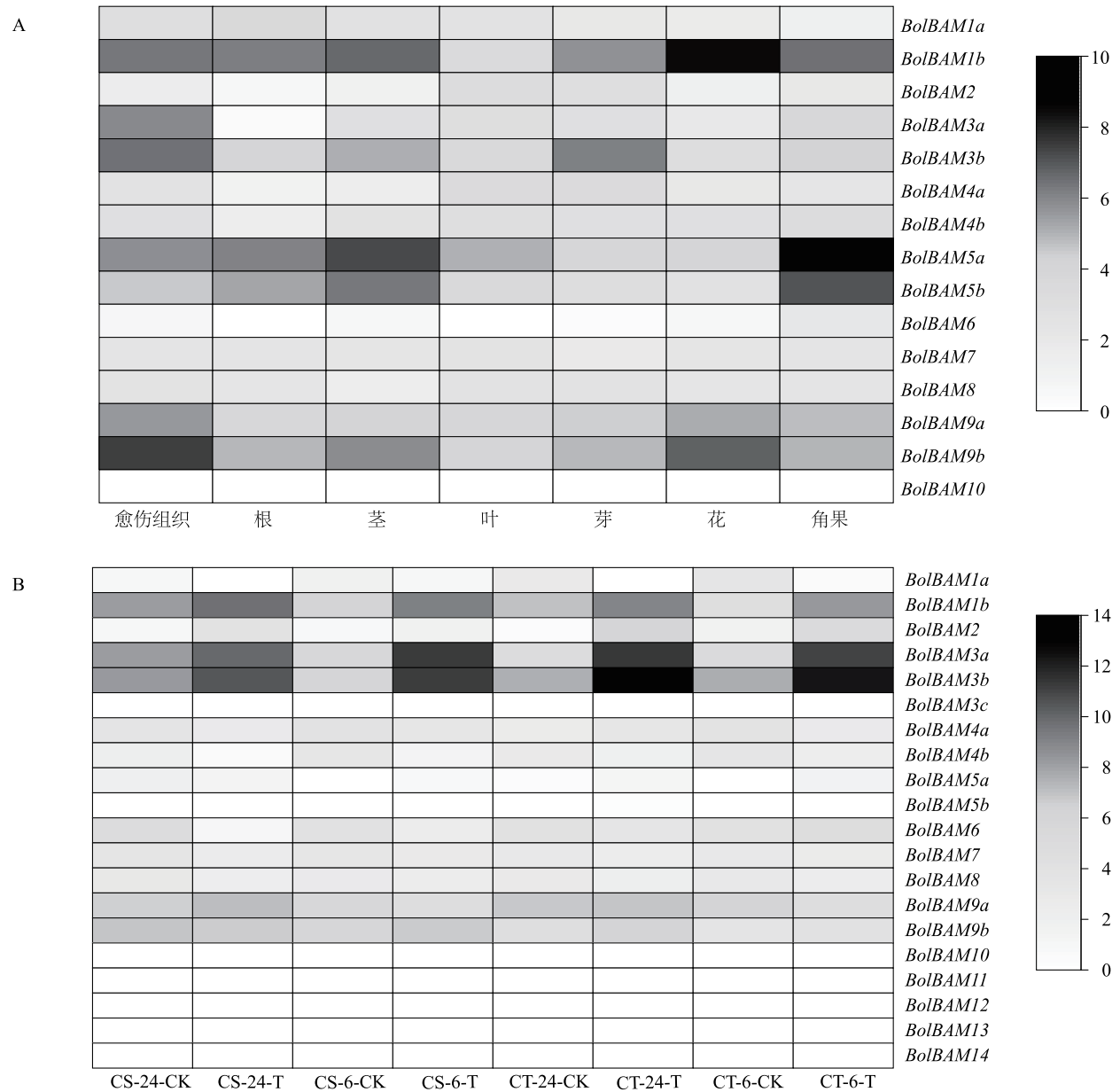
在低温处理 6 h、24 h 时均较 CK 显著上调,且冷敏材料 D9 中 *BolBAM1b* 的相对表达量显著高于耐冷材料 923;冷敏材料 D9 中 *BolBAM3a* 的相对表达量在低温处理 6 h 时高于耐冷材料 923,但在低温处理 24 h 时,其相对表达量显著低于 923;耐冷材料 923 中 *BolBAM3b* 的相对表达量在低温处理 6 h、24 h 时均显著高于冷敏材料 D9。

2.5 *BolBAM3a* 和 *BolBAM3b* 蛋白的亚细胞定位

用 Plant-mPLoc 进行在线预测,发现 *BolBAM3a*、*BolBAM3b* 蛋白主要存在于细胞质中。为了进一步明确 *BolBAM3a*、*BolBAM3b* 蛋白的亚细胞定位,构建了 *BolBAM3a*、*BolBAM3b* 基因和 GFP 的融合表达载体,通过农杆菌瞬时转化本氏烟草叶片。共聚焦显微镜的观察结果显示,*BolBAM3a* 定位于细胞核、细胞膜,*BolBAM3b* 定位于细胞质、细胞膜和细胞核(图 6)。

3 讨论

在非生物胁迫下,*BAM* 基因具有调节植物体内糖平衡的作用^[29-30]。本研究利用全基因组分析鉴定得到 20 个 *BolBAM* 基因,均含有糖结合域 14。根据氨基酸序列比对,将拟南芥、甘蓝和白菜的 *BAM* 蛋白分为 4 个亚组。甘蓝 *BolBAM* 基因家族在进化过程中扩大了家族成员,通过同源性分析发现,甘蓝、白菜的 *BAM* 基因均发生了基因复制,这可能是全基因组多倍化产生的,全基因组三倍化事件^[31-32]丰富了芸薹属植物中的 *BAM* 家族。由于甘蓝中 *BolBAM1*、*BolBAM3*、*BolBAM4* 和 *BolBAM9* 与拟南芥中同源的 *AtBAM1*、*AtBAM3*、*AtBAM4* 和 *AtBAM9* 发生了基因复制现象,导致加倍后的同源 *BolBAM1*、*BolBAM3*、*BolBAM4* 和 *BolBAM9* 不在同一条染色体上,加倍后仅 *BolBAM5a*、*BolBAM5b* 串联分布在 8 号



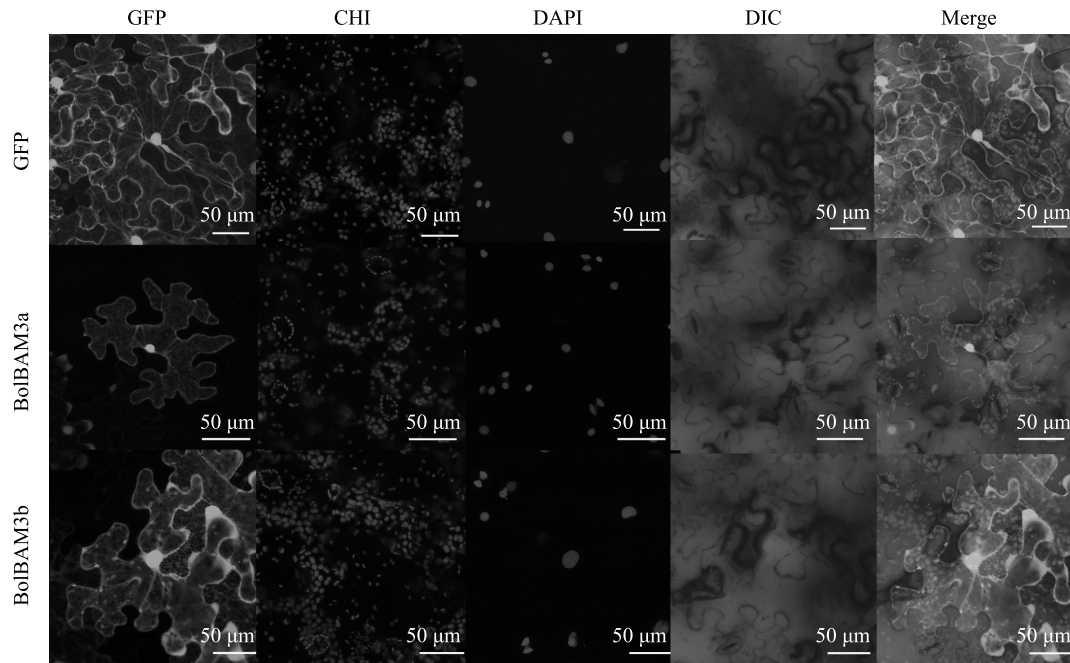
A;*BolBAM* 基因在愈伤组织、根、茎、叶、芽、花和角果中的表达;B;*BolBAM* 基因在低温胁迫下的表达。CS-24-CK:冷敏甘蓝 D9 常温处理 24 h;CS-24-T:冷敏甘蓝 D9 低温处理 24 h;CS-6-CK:冷敏甘蓝 D9 常温处理 6 h;CS-6-T:冷敏甘蓝 D9 低温处理 6 h;CT-24-CK:耐冷甘蓝 923 常温处理 24 h;CT-24-T:耐冷甘蓝 923 低温处理 24 h;CT-6-CK:耐冷甘蓝 923 常温处理 6 h;CT-6-T:耐冷甘蓝 923 低温处理 6 h。

图 5 *BolBAM* 基因在不同器官/组织中和低温胁迫下的表达情况
Fig.5 The expression of the *BolBAM* genes in different organs or tissues of cabbage and under low-temperature stress

染色体上。通过基因结构分析发现,在全基因组三倍化事件后,*BolBAM3a*、*BolBAM3b* 基因结构在进化过程中未发生变异,基因结构比较相似,而 *BolBAM3c* 出现了较多的外显子,这可能会导致其基因功能发生变化。

BAM 基因已被证明参与多种非生物胁迫,BAM 蛋白作为信号调节因子在应对非生物胁迫中起着积

极的调节作用^[33-35]。已有研究发现,拟南芥中 *AtBAM1*、*AtBAM3* 参与应激反应^[36],*AtBAM4* 可协助淀粉水解^[37]。本研究发现,甘蓝 923、D9 中 14 个 *BolBAM* 基因受到低温诱导表达,甘蓝 923、D9 中 *BolBAM1b* 的相对表达量在低温处理 6 h、24 h 时呈上升趋势,甘蓝 923 中 *BolBAM3b* 的相对表达量在低温处理 6 h 显著高于 D9,*BolBAM3a* 的相对表达



GFP:绿色荧光场;CHI:叶绿体自发荧光场;DAPI:4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)场(细胞核染色);DIC:明场;Merge:叠加场。

图6 *BolBAM3a* 和 *BolBAM3b* 蛋白在本氏烟草叶片中的亚细胞定位

Fig.6 Subcellular localization of *BolBAM3a* and *BolBAM3b* proteins in *Nicotiana benthamiana* leaves

量在低温处理 24 h 时达到峰值。甘蓝 923 中 *BolBAM3a*、*BolBAM3b* 的相对表达量在低温处理 24 h 时高于低温处理 6 h 时, D9 中 *BolBAM3a*、*BolBAM3b* 的相对表达量则表现出相反的趋势。在冷敏材料 D9 中, *BolBAM3a*、*BolBAM3b* 响应低温诱导最迅速, 而在耐冷甘蓝 923 中, *BolBAM3a*、*BolBAM3b* 可以持续被低温诱导。这些结果为后续开展 *BolBAM3a*、*BolBAM3b* 基因调控甘蓝低温响应的研究提供了重要参考。

参考文献:

- [1] 杨丽梅, 方智远, 张扬勇, 等. 中国结球甘蓝抗病抗逆遗传育种近年研究进展[J]. 园艺学报, 2020, 47(9): 1678-1688.
- [2] CHINNUSAMY V, ZHU J H, ZHU J K. Cold stress regulation of gene expression in plants[J]. Trends in Plant Science, 2007, 12(10): 444-451.
- [3] 徐磊, 林碧英, 林义章. 春化作用与甘蓝类蔬菜的生育障碍[J]. 亚热带植物科学, 2002, 31(4): 73-76.
- [4] 张伟, 余方伟, 李建斌, 等. 结球甘蓝 CBF 家族特征分析及低温诱导基因 *BoCBF1*、*BoCBF2a* 和 *BoCBF3* 的表达分析[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(1): 156-164.
- [5] 山溪, 秦文斌, 张振超, 等. 甘蓝蔗糖磷酸合酶家族的鉴定和表达分析[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(16): 53-60.
- [6] KAPLAN F, KOPKA J, SUNG D Y, et al. Transcript and metab-

olite profiling during cold acclimation of *Arabidopsis* reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content[J]. Plant Journal, 2007, 50(6): 967-981.

- [7] MARUYAMA K, TAKEDA M, KIDOKORO S, et al. Metabolic pathways involved in cold acclimation identified by integrated analysis of metabolites and transcripts regulated by DREB1A and DREB2A[J]. Plant Physiology, 2009, 150(4): 1972-1980.
- [8] SONG Y, ZHANG X Y, LI M Z, et al. The direct targets of CBFs: in cold stress response and beyond[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2021, 63(11): 1874-1887.
- [9] LEE J H, YU D J, KIM S J, et al. Intraspecific differences in cold hardiness, carbohydrate content and β -amylase gene expression of *Vaccinium corymbosum* during cold acclimation and deacclimation[J]. Tree Physiology, 2012, 32(12): 1533-1540.
- [10] GUPTA A K, KAUR N. Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants[J]. Journal of Biosciences, 2005, 30(5): 761-776.
- [11] SMEEKENS S, MA J K, HANSON J, et al. Sugar signals and molecular networks controlling plant growth[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2010, 13(3): 273-278.
- [12] STITT M, ZEEMAN S C. Starch turnover: pathways, regulation and role in growth[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2012, 15(3): 282-292.
- [13] SUN S H, HU C G, QI X J, et al. The AaCBF4-AaBAM3.1 module enhances freezing tolerance of kiwifruit (*Actinidia arguta*) [J].

- Horticulture Research, 2021, 8(1): 97.
- [14] MONROE J D, STORM A R, BADLEY E M, et al. β -amylase1 and β -amylase3 are plastidic starch hydrolases in *Arabidopsis* that seem to be adapted for different thermal, pH, and stress conditions [J]. Plant Physiology, 2014, 166(4): 1748-1763.
 - [15] PENG T, ZHU X F, DUAN N, et al. PtrBAM1, a β -amylase-coding gene of *Poncirus trifoliata*, is a CBF regulon member with function in cold tolerance by modulating soluble sugar levels [J]. Plant, Cell & Environment, 2014, 37(12): 2754-2767.
 - [16] SEKI M, NARUSAKA M, ABE H, et al. Monitoring the expression pattern of 1 300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray [J]. The Plant Cell, 2001, 13(1): 61-72.
 - [17] KAPLAN F, GUY C L. β -amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock [J]. Plant Physiology, 2004, 135(3): 1674-1684.
 - [18] KAPLAN F, GUY C L. RNA interference of *Arabidopsis* beta-amylase8 prevents maltose accumulation upon cold shock and increases sensitivity of PS II photochemical efficiency to freezing stress [J]. The Plant Journal, 2005, 44(5): 730-743.
 - [19] 靳舒荣, 王艳玫, 常悦, 等. 不同收获指数甘蓝型油菜 β -淀粉酶活性及其基因家族成员的表达分析 [J]. 作物学报, 2019, 45(8): 1279-1285.
 - [20] 郝心愿, 岳川, 唐湖, 等. 茶树 β -淀粉酶基因 *CsBAM3* 的克隆及其响应低温的表达模式 [J]. 作物学报, 2017, 43(10): 1417-1425.
 - [21] 杨泽峰, 徐暑晖, 王一凡, 等. 禾本科植物 β -淀粉酶基因家族分子进化及响应非生物胁迫的表达模式分析 [J]. 科技导报, 2014, 32(31): 29-36.
 - [22] YUE C, CAO H L, WANG L, et al. Effects of cold acclimation on sugar metabolism and sugar-related gene expression in tea plant during the winter season [J]. Plant Molecular Biology, 2015, 88(6): 591-608.
 - [23] 杜鹏, 彭晓君, 侯娟, 等. 马铃薯淀粉酶 *StBAM9* 互作蛋白的鉴定及其互作机制分析 [J]. 作物学报, 2023, 49(10): 2643-2653.
 - [24] ZHAO L Y, GONG X, GAO J Z, et al. Transcriptomic and evolutionary analyses of white pear (*Pyrus bretschneideri*) β -amylase genes reveals their importance for cold and drought stress responses [J]. Gene, 2019, 689: 102-113.
 - [25] CHEN H X, WANG T P, HE X N, et al. BRAD V_{3.0}: an upgraded Brassicaceae database [J]. Nucleic Acids Research, 2022, 50(D1): D1432-D1441.
 - [26] VOORRIPS R E. MapChart; software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs [J]. Journal of Heredity, 2002, 93(1): 77-78.
 - [27] CHEN C J, XIA R, CHEN H, et al. TBtools, a toolkit for biologists integrating various HTS-data handling tools with a user-friendly interface [J]. BioRxiv, 2018: 289660.
 - [28] LIU S Y, LIU Y M, YANG X H, et al. The *Brassica oleracea* genome reveals the asymmetrical evolution of polyploid genomes [J]. Nature Communications, 2014, 5: 3930.
 - [29] MONROE J D, STORM A R. Review: the *Arabidopsis* β -amylase (*BAM*) gene family: diversity of form and function [J]. Plant Science, 2018, 276: 163-170.
 - [30] HOU J, ZHANG H L, LIU J, et al. Amylases StAmy23, StBAM1 and StBAM9 regulate cold-induced sweetening of potato tubers in distinct ways [J]. Journal of Experimental Botany, 2017, 68(9): 2317-2331.
 - [31] WANG X W, WANG H Z, WANG J, et al. The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa* [J]. Nature Genetics, 2011, 43(10): 1035-1039.
 - [32] CHENG F, MANDÁKOVÁ T, WU J, et al. Deciphering the diploid ancestral genome of the mesohexaploid *Brassica rapa* [J]. The Plant Cell, 2013, 25(5): 1541-1554.
 - [33] THALMANN M, SANTELIA D. Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress [J]. New Phytologist, 2017, 214(3): 943-951.
 - [34] GALANI YAMDEU J H, GUPTA P H, SHAH A K, et al. Profiling of *StvacINV1*, *BAM1* and *INH2 α* expressions in relation to acid invertase and β -amylase activities during development of cold-induced sweetening in Indian potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers [J]. American Journal of Potato Research, 2015, 92(5): 603-608.
 - [35] FULTON D C, STETTLER M, METTLER T, et al. Beta-AMYLASE4, a noncatalytic protein required for starch breakdown, acts upstream of three active beta-amylases in *Arabidopsis* chloroplasts [J]. The Plant Cell, 2008, 20(4): 1040-1058.
 - [36] THALMANN M, COIRO M, MEIER T, et al. The evolution of functional complexity within the β -amylase gene family in land plants [J]. BMC Evolutionary Biology, 2019, 19(1): 66.
 - [37] LI J, FRANCISCO P, ZHOU W X, et al. Catalytically-inactive beta-amylase BAM4 required for starch breakdown in *Arabidopsis* leaves is a starch-binding-protein [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2009, 489(1/2): 92-98.

(责任编辑: 徐 艳)